

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
23. Mai 2002 (23.05.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/40978 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :	<b>G01N 23/00</b>	(72) Erfinder; und
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/DE01/04125	(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>DEBATIN, Michael</b> [DE/DE]; Safranberg 9, 89075 Ulm (DE). <b>STAHNKE,</b> <b>Karsten</b> [DE/DE]; Feuerbachstrasse 7, 89312 Günzburg (DE). <b>HUG, Hubert</b> [DE/DE]; Kingkerswellweg 6, D-89173 Lonsee (DE).
(22) Internationales Anmeldedatum:	30. Oktober 2001 (30.10.2001)	
(25) Einreichungssprache:	Deutsch	(74) Anwalt: <b>SCHÜSSLER, Andrea</b> ; Huber & Schüssler, Truderinger Str. 246, 81825 München (DE).
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch	
(30) Angaben zur Priorität:	100 53 747.2 30. Oktober 2000 (30.10.2000) DE	(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):	<b>DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS</b> [DE/DE]; Im Neuheimer Feld 280, 69120 Heidelberg (DE).	

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) **Title:** METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TWO FLUORESCENT EMISSIONS WITH A SINGLE LASER FLOW CYTOMETER

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR GLEICHZEITIGEN BESTIMMUNG ZWEIER FLUORESENZ-EMISSIONEN MIT EINM LASER-DURCHFLUSSZYTOMETER

(57) **Abstract:** In flow cytometry there sometimes occurs the problem that it is desirable to simultaneously determine two different fluorochromes for various physiological features, the peak emission wavelengths of which lie so close together that the emissions overlap. A simultaneous measurement of such fluorochromes is conventionally not possible, even with application of an electronic compensation. The invention thus relates to a method for the simultaneous determination of the fluorescent emissions of a first fluorochrome and a second fluorochrome, the emission wavelength region of which overlaps that of the first fluorochrome, in a single laser flow cytometer with two fluorescent channels of various receiver wavelengths. Said method comprises the following steps: A) stimulation of the first fluorochrome of reference cells marked with said fluorochrome, by means of a laser beam suitable for both fluorochromes; B) adjustment of the photomultiplier tube voltage in the second fluorescence channel, set for the emissions from the second fluorochrome, to a value at which no fluorescence emission signal is detected in the second fluorescence channel as a result of the first fluorochrome; C) stimulation of the fluorochrome of the sample cells, marked with the first and second fluorochrome by means of the laser beam; D) measurement of the fluorescence emission signal of the first fluorochrome in the sample cells in the first fluorescence channel set for the emissions of the first fluorochrome and E) measurement of the fluorescence emission signal of the second fluorochrome in the sample cells in the second fluorescence channel.

(57) **Zusammenfassung:** In der Durchflußzytometrie ergibt sich mitunter das Problem, daß man gleichzeitig zwei verschiedene Fluorochrome für unterschiedliche physiologische Merkmale messen möchte, deren Emissionspeak-Wellenlängen so beieinander liegen, daß die Emissionen sich überlappen. Eine gleichzeitige Messung solcher Fluorochrome war bislang mit einem Einlaser-Durchfluß-Zytometer auch bei Verwendung elektronischer Kompensation nicht möglich. Die Erfindung ist daher gerichtet auf ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Fluoreszenz-Emmissionen eines ersten Fluorochroms und eines zweiten Fluorochroms, welches einen mit dem ersten Fluorochrom überlappenden Emissionswellenlängenbereich aufweist, in einem Ein-Laser-Durchflußzytometer mit zwei Fluoreszenzkanälen unterschiedlicher Empfangswellenbereichen, wobei das Verfahren die folgenden Schritten aufweist: A) Anregen des ersten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten Referenzzellen mit einem für beide Fluorochrome geeigneten Laserstrahl; B) Einstellen der Photomultiplier-Röhrenspannung des zweiten Fluoreszenzkanals, welcher an die Emission des zweiten Fluorochroms angepasst ist, auf einen Wert, bei dem kein vom ersten Fluorochrom im zweiten Fluoreszenzkanal erzeugtes Fluoreszenz-Emissions-Signal detektiert wird; C) Anregen der Fluorochrome von mit erstem und zweitem Fluorochrom markierten, zu messenden Zellen mit dem Laserstrahl; D) Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des ersten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im ersten Fluoreszenzkanal, welcher an die Emission des ersten Fluorochroms angepasst ist; und E) Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des zweiten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im zweiten Fluoreszenzkanal.

**WO 02/40978 A2**



(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

**Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung zweier  
Fluoreszenz-Emissionen mit einem Einlaser-Durchflußzytometer**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Fluoreszenz-Emissionen eines ersten Fluorochroms und eines zweiten Fluorochroms, welches ein mit dem ersten Fluorochrom überlappenden Emissionswellenlängenbereich aufweist.

Durchflußzytometrie ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe die Fluoreszenz einzelner, mit einem Fluorochrom markierter Zellen gemessen werden kann. Ein Durchflußzytometer umfasst einen Vorratsbehälter mit einer Zellsuspension markierter Zellen, einer Fallstrecke, die ein dünner Tröpfchenfaden, der aus einer Öffnung des Vorratsbehälters ausfliesst, durchqueren muß, einem Laser, welcher den Tröpfchenfaden bestrahlt, sowie einem oder mehreren Meßkanälen, welche die Emissions-Fluoreszenz des Tröpfchenfadens messen können. Die Herstellung des Tröpfchenfadens ist hierbei kritisch, da erreicht werden soll, daß sich einzelne Tröpfchen bilden, die jeweils nur eine Zelle enthalten. Auf diese Weise kann erreicht werden, daß der Laser auch nur jeweils eine Zelle bestrahlt, so daß von den Meßkanälen die Fluoreszenz einer einzelnen Zelle gemessen wird. Eine angeschlossene Datenverarbeitungsanlage speichert die einzelnen Messungen und kann eine statistische Auswertung durchführen.

Ein Prinzip der Durchflußzytometrie ist die Messung relativer Fluoreszenzen mittels spannungsgesteuerter Photomultiplier-Röhren (PMTs) als Meßkanäle. Dabei wird das Fluoreszenzsignal auf einer logarithmischen Skala von  $10^0$  (Beginn der 1. Dekade) bis  $10^4$  (Ende der 4. Dekade) dargestellt. Eine Kalibrierung auf diesen Wertebereich erfolgt anhand von negativen und positiven Kontrollstandards, welche im einen Fall nur Hintergrundfluoreszenz und im anderen Fall

die maximal erwartbare, zu bestimmende Fluoreszenz aufweisen sollen.

Die dabei verwendeten PMT-Spannungen sind vom eingesetzten Durchflußzytometer abhängig und werden anhand der jeweils verwendeten Kontrollstandards eingestellt.

Zusätzlich kann eine elektronische Kompensation der Messwerte vorgenommen werden. Die elektronische Kompensation ist ein Standardverfahren in der Mehrfarbendurchflußzytometrie. Werden Zellen mit zwei oder mehr Fluorochromen markiert, entsteht manchmal das Problem, daß aufgrund der Überlappung der Emissions-Fluoreszenzspektren bei starken Fluoreszenzsignalen eine Einstrahlung in den benachbarten Fluoreszenzkanal auftritt und dort zu einem falsch positiven Signal führt. Dieses wird im Rahmen der elektronischen Kompensation durch elektronische Subtraktion für jedes einzelne Meßereignis korrigiert, indem von der falsch positiven Fluoreszenz ein Prozentsatz der Ausgangsfluoreszenz abgezogen wird.

In der Durchflußzytometrie ergibt sich mitunter das Problem, daß man gleichzeitig zwei verschiedene Fluorochrome, welche unterschiedliche physiologische Merkmale charakterisieren sollen, messen möchte, deren Emissionspeak-Wellenlängen so beieinander liegen, daß die Emissionen, gestreut über den üblichen Wellenlängenbereich, sich überlappen. Eine gleichzeitige Messung solcher Fluorochrome war bislang mit einem Einlaser-Durchfluß-Zytometer auch bei Verwendung elektronischer Kompensation nicht möglich, da häufig zumindest bei einem der Fluoreszenzkanäle eine Überlagerung des für den anderen Fluoreszenzkanal bestimmten Signals erfolgte, so daß das in diesem Fluoreszenzkanal zu messende Signal nicht das damit gemessene Fluorochrom widerspiegelte. Bei dieser Situation mußte auf Mehrlaser-Durchfluß-Zytometer, beispielsweise unter Verwendung UV-anregbarer Substrate und einer UV-Anregung, zurückgegriffen werden. Diese Geräte sind sehr teuer und aufwendig zu bedienen. Mit den in üblichen klinischen Labors und Forschungseinrichtungen vorhandenen

Einlaser-Routinegeräten ist die simultane Messung solcher benachbart emittierender Fluorochrome nicht möglich gewesen. Ein Beispiel für eine solche Situation, bei der bestimmte Fluorochrome verwendet werden müssen, um die gewünschten Aussagen über die untersuchten Zellen machen zu können, findet sich im Bereich der Apoptoseuntersuchung.

Apoptose ist ein biologischer Prozeß, bei dem eine Kette von genetisch kontrollierten Ereignissen in Zellen ausgelöst wird, die den gesteuerten Tod und die effiziente Beseitigung der betroffenen Zellen bewirken.

Ein Nachweis von Apoptose und Apoptose-regulierender Moleküle ist entscheidend für Diagnose und Therapie verschiedener Erkrankungen, wie Autoimmunerkrankungen, Virusinfektionen, neurodegenerative Erkrankungen, Knochenmark-insuffizienzsyndromen, Leukämien und soliden Tumoren.

Eine der möglichen Anwendungen ist die Zytostatika-Testung. Zytostatika induzieren Apoptose, indem sie wesentliche Elemente des Apoptoseprogramms aktivieren. Die Effektivität von Zytostatika hängt davon ab, in welchem Ausmaß die molekularen Apoptoseregulatoren aktiviert werden.

Eine wichtige Größe bei der Bestimmung der Apoptose ist das Maß an Caspaseaktivierung. Die Familie der Caspaseproteine bewirkt bei der Apoptose einen Proteinabbau. Eine durchflußzytometrische Bestimmung der Caspaseaktivierung ist durch die Verwendung spezieller Rhodamin 110-Derivate möglich. Rhodamin 110 ist ein Fluorochrom, welches bei einer Wellenlänge von 497 nm optimal angeregt werden kann und dann eine Fluoreszenz-Emission erzeugt, deren Peak bei 520 nm liegt. Das Fluorochrom Rhodamin 110 wird mit Peptiden gekoppelt, welche bei einer Caspaseaktivierung von diesen Caspases wieder vom Rhodamin 110 abgespaltet werden. Durch die Abspaltung wird die fluorochrome Eigenschaft des Rhodamin 110 aktiviert und kann im Durchflußzytometer gemessen werden.

Ein weiteres Merkmal der Apoptose ist die Mitochondrienaktivierung, die mit einer Verminderung des Mitochondrienmembranpotentials einher geht. Durch die Verwendung von Mitochondrienmembranpotential-sensitiven Fluorochromen ist auch die Bestimmung dieser Änderungen des Mitochondrienmembranpotentials einer durchflußzytometrischen Untersuchung zugänglich. Eine beispielsweise verwendbare Substanz ist 3,3`-Dihexyloxacarbocyaninjodid (DiOC6(3)). Diese Substanz ist bei einer Wellenlänge von 484 nm optimal anregbar. Sowohl Rhodamin 110 als auch DiOC6(3) können damit praktisch mit einem Laser, beispielsweise einem Argonlaser von 488 nm Wellenlänge angeregt werden. Allerdings liegt der Peak der Fluoreszenz-Emission von DiOC6(3) bei 501 nm, und somit lediglich 19 nm vom Peak des Rhodamin 110 entfernt. Daraus ergibt sich das Problem, daß bei einer normalen Messung der Fluoreszenz-Emission die Rhodamin 110 Fluoreszenz-Emission eine genaue Messung der DiOC6(3)-Messung auf einem anderen Fluoreszenzkanal verhindert.

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mittels dem auch bei einfachen Einlaser-Durchflußzytometern eine Messung zweier solcher zunächst kollidierender Fluorochrome möglich wird.

Diese Aufgabe wird gelöst durch das Verfahren gemäß dem unabhängigen Patentanspruch 1.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen, Aspekte und Details ergeben sich aus den abhängigen Patentansprüchen, der Beschreibung und der beigefügten Figur.

Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, daß man durch Senkung der Photomultiplier-Röhrenspannung an demjenigen Fluoreszenzkanal, an dem das erste Fluorochrom gemessen werden soll, das Signal des störenden zweiten Fluorochroms soweit unterdrücken kann, daß eine einwandfreie Messung des betroffenen ersten Fluorochroms möglich wird.

Insbesondere liegt der Erfindung die Erkenntnis zugrunde, daß Mitochondrienmembranpotential-sensitives Fluorochrom gleichzeitig mit Rhodamin 110 gemessen werden kann, wenn am Fluoreszenzkanal zur Messung des Mitochondrienmembranpotential-sensitiven Fluorochroms die Photomultiplier-Röhrenspannung gegenüber dem normalen Maß gesenkt wird und dadurch ein Rhodamin 110-Störsignal hinreichend unterdrückt werden kann.

Die Erfindung ist daher gerichtet auf ein Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Fluoreszenz-Emissionen eines ersten Fluorochroms und eines zweiten Fluorochroms, welches einen mit dem ersten Fluorochrom überlappenden Emissionswellenlängenbereich aufweist, in einem Ein-Laser-Durchflußzytometer mit zwei Fluoreszenzkanälen unterschiedlicher Empfangswellenbereichen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:

- A) Anregen des ersten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten Referenzzellen mit einem für beide Fluorochrome geeigneten Laserstrahl;
- B) Einstellen der Photomultiplier-Röhrenspannung des zweiten Fluoreszenzkanals, welcher an die Emission des zweiten Fluorochroms angepasst ist, auf einen Wert, bei dem kein vom ersten Fluorochrom im zweiten Fluoreszenzkanal erzeugtes Fluoreszenz-Emissions-Signal detektiert wird;
- C) Anregen der Fluorochrome von mit erstem und zweitem Fluorochrom markierten, zu messenden Zellen mit dem Laserstrahl;
- D) Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des ersten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im ersten Fluoreszenzkanal, welcher an die Emission des ersten Fluorochroms angepasst ist

und

F) Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des zweiten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im zweiten Fluoreszenzkanal.

Unter Anregen ist hierbei zu verstehen, daß der Laserstrahl auf die Tröpfchen mit den Zellen gerichtet wird und es dadurch in oder an den Zellen zu einer Emissions-Fluoreszenz kommt. Diese Fluoreszenz wird mittels der Fluoreszenzkanäle gemessen, wobei diese in ihrer spektralen Empfindlichkeit der zu erwartenden Emission angepasst sein müssen, um die Fluoreszenz wahrnehmen zu können. Die erzeugte Fluoreszenz wird als ein Signal bezeichnet, welches in den Fluoreszenzkanälen quantitativ bestimmt (gemessen) werden kann.

Das erfindungsgemäße Verfahren macht Gebrauch von einer Kalibriermethode, bei der Referenzzellen verwendet werden. Diese sind definiert als solche Zellen, welche in ihren Eigenschaften möglichst weitgehend den zu bestimmenden Zellen entsprechen, die jedoch in einem "Nullzustand" vorliegen, bei dem keine Manipulationen mit den Zellen vorgenommen worden sind, die zu einer Fluoreszenzänderung oder -bildung führen. Demgegenüber sind die zu messenden Zellen solche, in denen die zu untersuchenden Vorgänge ausgelöst bzw. vorgenommen worden sind, und welche daher eine veränderte Fluoreszenz aufweisen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann dadurch weiter in seiner Meßgenauigkeit verbessert werden, daß verschiedene, weitere Kalibrier- und Kontrollschritte eingeführt werden. So kann das Verfahren dadurch verändert sein, daß am zweiten Fluoreszenzkanal zusätzlich eine elektronische Kompensation von 60-90 % vorgenommen wird. Die elektrische Kompensation am zweiten Fluoreszenzkanal kann beispielsweise günstigerweise 80 % betragen. Durch diese Maßnahme kann die erfindungsgemäß gewünschte Unterdrückung von Cross-Signalen weiter verbessert werden.

Weiterhin können vor Schritt A folgende Schritte durchgeführt werden:

- Anregen unmarkierter Referenzzellen mit dem Laserstrahl; und
- Einstellen des von den Fluoreszenzkanälen erzeugten Signals auf einen mittleren Wert innerhalb der ersten Dekade einer Meßwertskala.

Hierbei handelt es sich um Standardkalibrierungsmaßnahmen, da ein Durchflußzytometer, wie oben erläutert, relative Werte bestimmt.

Auch ist es möglich, daß das erfindungsgemäße Verfahren folgende zusätzlichen Schritte vor Schritt C aufweist:

- Anregen des zweiten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten Referenzzellen mit dem Laserstrahl;
- Einstellen einer elektronischen Kompensation am ersten Fluoreszenzkanal, so daß kein Signal oberhalb der ersten Dekade ( $10^1$ ) am ersten Fluoreszenzkanal gemessen wird;
- Speichern der Einstellung;

und daß es folgende weitere Kontrollschritte nach Schritt D aufweisen kann:

- Anregen des zweiten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten zu messenden Zellen mit dem Laserstrahl;
- Einstellen der gespeicherten Einstellung;
- Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des zweiten

Fluorochroms in den zu messenden Zellen im zweiten Fluoreszenzkanal; und

- Vergleichen des gemessenen Signals mit dem in Schritt D gemessenen Signal.

Durch diese Maßnahme wird geprüft, ob ein korrektes Signal bezüglich des zweiten Fluorochroms im zweiten Kanal gemessen werden kann. Die eingestellte Kompensation sorgt dafür, daß die gemessenen Fluoreszenzwerte zwischen  $10^0$  und  $10^1$  liegen, d.h. zwischen 1 und 10 auf der Meßskala.

Als zusätzliche Kontrolle kann das Verfahren folgende weiteren Kontrollschritte aufweisen:

- Anregen des ersten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten zu messenden Zellen mit dem Laserstrahl;
- Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des ersten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im ersten Fluoreszenzkanal;
- Vergleichen des gemessenen Signals mit dem gespeicherten Signal und mit dem bei der Messung in Schritt D erhaltenen Signal.

Diese zusätzliche Kontrolle setzt vorteilhafterweise voraus, daß die oben skizzierte Speicherung des Messwertes erfolgt ist.

Mit diesen Verfahrensschritten und ihren Kombinationen lässt sich eine genaue, kontrollierte Messung zweier Fluorochrome in einem Ein-Laser-Durchflußzytometer durchführen, wodurch sich bisherige, methodische Schwierigkeiten ausräumen lassen.

Beispielsweise liegt die methodische Schwierigkeit der simultanen Messung von Rhodamin 110 und den

potential-sensitiven Fluorochromen in der Überlappung der Fluoreszenzspektren, die es im Stand der Technik nicht erlaubt, beide Fluorochrome gleichzeitig zu messen. Rhodamin 110 hat eine starke Emission bei 540 nm, der Wellenlänge, bei der die potential-sensitiven Fluorochrome gemessen werden. Das bedeutet, daß ein positives Rhodamin 110-Signal im ersten Fluoreszenzkanal (beispielsweise Kanal FL2 bei Becton-Dickinson-Durchflußzytometern) ein zusätzliches Signal im zweiten Fluoreszenzkanal (FL1) des Durchflußzytometers hervorruft. Reduziert man die Photomultiplier-Röhrenspannung von FL1 wird auch die Sensitivität für die Einstrahlung von Rhodamin 110 aus dem ersten in den zweiten Fluoreszenzkanal vermindert.

Nach Reduktion der Photomultiplier-Röhrenspannung gelingt es die Einstrahlung in den FL1-Kanal (zweiter Kanal) zu verhindern. Für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials mittels DiOC6(3) ist die Reduktion der Photomultiplier-Röhrenspannung unschädlich, da ein normales Membranpotential ein extrem starkes Fluoreszenz-Signal produziert und auch bei reduzierter Photomultiplier-Röhrenspannung gemessen werden kann. Auch die Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials kann trotz Reduktion der Photomultiplier-Röhrenspannung verlässlich detektiert werden.

Wenn die vorliegende Erfindung für das Rhodamin 110/DiOC6(3) Fluorochrompaar verwendet werden soll, sollten die Peptid-Rhodamin 110-Substratkonzentration und die DiOC6(3)-Konzentration für die Anwendung der erfindungsgemäßen Methode in einem engen Bereich gehalten und an die Durchflußzytometer-Einstellungen angepaßt werden. Die Fluoreszenz des freigesetzten Rhodamin 110 und des Membranpotential-sensitiven Fluorochroms können dann simultan auf Einzelzellebene mittels Einlaser-Durchflußzytometrie quantifiziert werden.

Daher wird das Verfahren vorzugsweise zur gleichzeitigen

fluorometrischen Bestimmung von zumindest zwei Apoptose-Parametern verwendet.

Hierbei können, wie dargestellt, die ausgewählten Parameter die Caspase-Aktivierung und die Mitochondrien-Aktivierung sein. Die Caspase-Aktivierung wird vorzugsweise durch Messung der Degradierung eines Caspase-Zielpeptids bestimmt, während die Mitochondrien-Aktivierung durch Messung von Membranpotential-Veränderungen, insbesondere von Minderungen der Mitochondrienmembran bestimmt werden kann.

Gemäß dem Einsatzzweck kann das erste Fluorochrom zumindest ein Caspase-spaltbares Rhodamin 110-Derivat sein. Beispielsweise kann es ein Peptid-Rhodamin 110 aufweisen.

Da eine ganze Reihe von Caspassen in Zellen vorhanden ist, lässt sich durch spezifische Anpassung der Rhodamin-Derivate das Verhalten einer bestimmten für dieses Rhodamin-Derivat spezifischen Caspase herausfinden.

Auch ist es möglich, mehr als ein Rhodamin 110-Derivat zu verwenden. Typische Caspase-spezifische, bevorzugte Rhodamin 110-Derivate sind (AspGluValAsp)<sub>2</sub>-Rhodamin 110 [= (DEVD)<sub>2</sub>-Rhodamin 110] und/oder (Asp)<sub>2</sub>-Rhodamin 110.

Das zweite Fluorochrom kann vorzugsweise ein Membranpotential-sensitives Fluorochrom, beispielsweise 3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid sein.

In Abhängigkeit von den verwendeten Fluorochromen wird sich die durch den Laserstrahl vermittelte Anregung in ihrer Wellenlänge unterscheiden. Im bevorzugten Setting zum Testen des Apoptose-Verhaltens von Zellen erfolgt die Anregung vorzugsweise bei einer Wellenlänge von 488 nm, beispielsweise mittels eines Argon-Lasers.

In einer spezifischen Ausführungsform kann durch die Anwendung von Substraten, die spezifisch die Aktivität einzelner

Caspasenisoenzyme detektieren, die Stellung einzelner Caspasenisoenzyme im Verhältnis zur Aktivierung der Mitochondrien identifiziert werden (Initiator- und Effektorcaspase). Für die Fortentwicklung von Zytostatika ist es entscheidend, Substanzen zu identifizieren, die beide Signalwege aktivieren, da nur dann von einer sicheren Apoptoseinduktion ausgegangen werden kann. Durch die Anwendung der Durchflußzytometrie ist das erfindungsgemäße Verfahren besonders für die Testung der Chemosensitivität primärer Tumor- und Leukämiezellen geeignet, da damit in diesen heterogenen Zellpopulationen potentiell resistente Subpopulationen identifiziert werden können.

Weiterhin erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren eine Verbindung der Aktivitätssmessung zweier Signalwege mit der Detektion von Oberflächenepitopen mittels fluorochromatisierter Antikörper. Damit ist es möglich, resistente und sensitive Subpopulationen weiter, zum Beispiel bezüglich ihres Differenzierungsgrades zu charakterisieren. Schließlich ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren durch die Verbindung mit der Detektion von Phosphatidylserinexternalisierung mittels Annexin-V ein umfassendes Monitoring von den frühen Apoptoseschritten der Caspase- und Mitochondrienaktivierung bis zu einem späten Schritt.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist bei einer Reihe von Anwendungsgebieten einsetzbar, die über die Aufklärung von Apoptosesignalwegen hinausgehen und generell unabhängige Ereignisse in Zellen miteinander korrelierbar machen. Das der Erfindung zu Grunde liegende Prinzip ist nicht von der Verwendung von Rhodamin und Membranpotential-sensitiven Fluorochromen abhängig, sondern kann in beliebigen Problemstellungen mit ähnlichen Fluorochromanforderungen eingesetzt werden. Der entscheidende Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der geringe Kostenaufwand, eine einfache und schnelle Durchführbarkeit, sowie die Möglichkeit, derzeit verfügbare Routinedurchflußzytometer für die Messung zu verwenden. Damit ist gewährleistet, daß das

erfindungsgemäße Verfahren als diagnostische Anwendung zur Chemosensitivitätsmessung bei Leukämien und Tumoren, beispielsweise rasche Verbreitung finden wird.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren erläutert, welche zeigen:

Figur 1a: Jurkat-Zellen ohne Cytarabin-Behandlung;

Figur 1b: Jurkat-Zellen mit einer dreistündigen Cytarabin-Behandlung; und

Figur 1c: Jurkat-Zellen mit einer sechsstündigen Cytarabin-Behandlung. Der Konturenplot der Figur 1 zeigt hierbei das DiOC6(3)-Signal in FL1 versus dem Rhodamin 110-Signal in FL2.

Im folgenden soll die Erfindung an einem Beispiel erläutert werden, wobei auf die beigefügte Figur Bezug genommen werden wird.

### **Beispiel**

Zur Verwendung kommen in diesem Ausführungsbeispiel Jurkat-Zellen und primäre Leukämiezellen, die in einem RPMI 1640 (Biochrom KG, Berlin) Puffer mit 10 % Hitze-inaktiviertem fötalem Kalbserum (Biochrom), 200 mM Glutamin (Gibco Life Technologies, Paisly), und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco) in einer Konzentration von 0,5 bis  $1,0 \times 10^6$  Zellen/ml gezogen wurden. Rhodamin 110 (R)-markierte Peptide der Struktur (Asp)2-Rhodamin 110 (D2R) und (Z-DEVD)2R mit einer zusätzlichen N-Benzoylcarbonyl-Gruppe am N-terminalen Asp-Rest, wurden durch Interaktivia Biotechnologie GmbH (Ulm, DE) synthetisiert, wobei die gekoppelten Peptide eine Reinheit von mindestens 95 % aufwiesen. Die Stammlösung ist ein DMSO-Ethanol-Gemisch in einem Verhältnis von 1:1.

Die CD-95-Rezeptor-Stimulation, welche im vorliegenden Beispiel der Erfindung verwendet wird, wird mittels des monoklonalen Antikörpers anti-APO-1 (3) bei einer Konzentration von einem 1 µg/ml in der Anwesenheit von 10 ng/ml Protein A als Crosslinker durchgeführt, wobei die Apoptose in 1 ml (bei 10<sup>6</sup> Zellen/ml) an Zellen durchgeführt wurde. Die Zellen werden in PBS gewaschen und 2-Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 10 mM zugegeben.

Die derart vorbehandelnden Zellen können nunmehr mit den Fluorochromen untersucht werden. Hierzu werden die Rhodamin-markierten Peptidsubstrate in einer Endkonzentration von typischerweise 50 µm der Zellsuspension zugegeben. Nach Waschen in 1 x PBS und Resuspension in 300 µl 1 x PBS kann dieser Ansatz einer FACS-Analyse unterzogen werden, um als Kontrolle zu dienen.

Um Mitochondrienmembranpotential-Veränderungen und Rhodamin-Derivat-Spaltung messen zu können, werden Zellen mit PBS-FACS in einer Konzentration von 5 x10<sup>5</sup> Zellen/ml resuspendiert und mit beispielsweise D2R und DiOC6(3) bei einer Konzentration von 460 ng/ml für zwölf Minuten bei 37° im Dunkeln inkubiert. Unmittelbar daran schließt sich eine Analyse im Durchflußzytometer an. Als eine Kontrolle für herunter regulierte Mitochondrienmembranpotential Differenzen werden die Zellen auch mit Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (mCICCP, Sigma Chemicals, Deisenhofen, DE) inkubiert.

Folgende Kontrollstandards werden dabei eingeführt:

1. Mit unmarkierten Zellen, also ohne Rhodamin 110 und ohne DiOC6(3), wird das Signal in allen Fluoreszenzkanälen auf einen mittleren Wert innerhalb der ersten Dekade der logarithmischen Meßskala des Zytometers eingestellt (Autofluoreszenzstandard).
2. Mit DiOC6(3) markierte Zellen, die nicht mit Rhodamin 110 inkubiert worden sind, wird die elektronische

Kompensation für den ersten Fluoreszenzkanal, beispielsweise FL2 bei Becton-Dickenson-Geräten, so eingestellt, daß keine Fluoreszenz oberhalb von  $10^1$  in FL2 gemessen wird (Kompensationsstandard für die erste Fluoreszenz). Diese Geräteeinstellung wird für Schritt 4 gespeichert.

3. Mit Rhodamin 110 markierte Zellen, in denen Apoptose induziert wurde, die also ein positives Caspase-Signal in beiden verwendeten Fluoreszenzkanälen geben, wird nun die Fluoreszenz im zweiten Kanal, beispielsweise FL1, kompensiert. Dazu wird die elektronische Kompensation auf Werte um 80 % eingestellt und die Photomultiplier-Röhrenspannung als Verstärkung für den zweiten Kanal soweit reduziert, daß kein Fluoreszenz-Signal im zweiten Kanal detektiert wird (Kompensationsstandard für das erste Fluorochrom, Rhodamin 110).
4. Mit DiOC6(3) markierten Zellen, die nicht mit Rhodamin 110 markiert sind und in denen eine Apoptose ausgelöst wurde, wird nunmehr geprüft, ob ein korrektes DiOC6(3)-Signal am zweiten Fluoreszenzkanal FL1 gemessen werden kann (Standard für DiOC6(3)). Dazu werden die Geräteeinstellungen, welche unter 2. abgespeichert wurden, kurzzeitig wieder hergestellt und das aufgenommene Signal mit dem Signal der Geräteeinstellung unter 3. verglichen.
5. Als zusätzliche Kontrolle werden Rhodamin 110-markierte Zellen, in denen Apoptose induziert wurde, mit den Geräte-Einstellungen unter 2. und den endgültigen Einstellungen unter 3. gemessen und die Signale verglichen.

Zusätzlich kann bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Konzentration von DiOC6(3) so angepasst werden, daß bei konventioneller Durchflußzytometer-Einstellung (nach Autofluoreszenzstandard) ein normales Mitochondrien-Membranpotential ein Signal in der vierten Dekade ( $10^3$ - $10^4$ ) im zweiten Fluoreszenzkanal, im vorliegenden

Beispiel FL1 erzeugt, während ein Apoptose-bedingt reduziertes Membranpotential in der dritten Dekade gemessen wird. Damit lässt sich auch bei erheblich reduzierter Photomultiplier-Röhrenspannung, welche für die Kompensation des Rhodamin 110-Signals erforderlich ist, eine Mitochondrienmembranpotential-Erniedrigung zuverlässig messen.

Da Rhodamin 110 eine Emission bei 540 nm hat, erzeugt es ein Signal im Fluoreszenzkanal 1 (FL1), indem auch das DiOC6(3)-Signal gemessen wird. Um dieses Problem zu beseitigen, wird die Photomultiplier-Röhrenspannung von FL1 erniedrigt, um die Sensitivität für das Rhodamin 110-Signal zu senken. Nach Senkung der Photomultiplier-Röhrenspannung ist es möglich, das Rhodamin 110-Signal zu kompensieren und es damit vollständig vom FL1-Kanal zu eliminieren.

Die Detektion eines erniedrigten Mitochondrienmembranpotentials wird durch die Reduktion der Photomultiplier-Röhrenspannung nicht beeinträchtigt, da das Mitochondrienmembranpotential ein starkes DiOC6(3)-Signal erzeugt, das auch noch bei reduzierter Photomultiplier-Röhrenspannung detektiert werden kann.

Die in Figur 1 gezeigten Analysen sind mit einem FACScalibur (TM) Zytometer der Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, DE durchgeführt worden, der mit einem 488 nm Argon Laser und einem 650 nm rotem Diolenlaser ausgestattet ist. Mindestens 50.000 Ereignisse pro Probe wurden aufgenommen, in Listmode-Dateien gespeichert und im Anschluß mit der Cellquest (TM) Software der Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, DE analysiert.

Die Detektion der D2R-Spaltung kann mit der Messung des Mitochondrienmembranpotentials kombiniert werden. Hierzu werden Jurkatzellen mit 10 µg Cytarabin für drei beziehungsweise sechs Stunden behandelt. Die Zellen werden gleichzeitig mit D2R und DiOC6(3) inkubiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt somit die simultane Messung zweier voneinander unabhängiger Fluorochromsignale mittels konventioneller Durchflußzytometrie in lebenden Zellen.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung der Fluoreszenz-Emmissionen eines ersten Fluorochroms und eines zweiten Fluorochroms, welches einen mit dem ersten Fluorochrom überlappenden Emissionswellenlängenbereich aufweist, in einem Ein-Laser-Durchflußzytometer mit zwei Fluoreszenzkanälen unterschiedlicher Empfangswellenbereichen, wobei das Verfahren die folgenden Schritte aufweist:
  - A) Anregen des ersten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten Referenzzellen mit einem für beide Fluorochrome geeigneten Laserstrahl;
  - B) Einstellen der Photomultiplier-Röhrenspannung des zweiten Fluoreszenzkanals, welcher an die Emission des zweiten Fluorochroms angepasst ist, auf einen Wert, bei dem kein vom ersten Fluorochrom im zweiten Fluoreszenzkanal erzeugtes Fluoreszenz-Emissions-Signal detektiert wird;
  - C) Anregen der Fluorochrome von mit erstem und zweitem Fluorochrom markierten, zu messenden Zellen mit dem Laserstrahl;
  - D) Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des ersten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im ersten Fluoreszenzkanal, welcher an die Emission des ersten Fluorochroms angepasst ist;

und

- E) Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des zweiten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im zweiten Fluoreszenzkanal.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß am zweiten Fluoreszenzkanal zusätzlich eine elektronische Kompensation von 60-90 % vorgenommen wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrische Kompensation am zweiten Fluoreszenzkanal 80 % beträgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß vor Schritt A folgende Schritte durchgeführt werden:
  - Anregen unmarkierter Referenzzellen mit dem Laserstrahl; und
  - Einstellen des von den Fluoreszenzkanälen erzeugten Signals auf einen mittleren Wert innerhalb der ersten Dekade einer Meßwertskala.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende zusätzliche Schritte vor Schritt C aufweist:
  - Anregen des zweiten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten Referenzzellen mit dem Laserstrahl;
  - Einstellen einer elektronischen Kompensation am ersten Fluoreszenzkanal, so daß kein Signal oberhalb der ersten Dekade (101) am ersten Fluoreszenzkanal gemessen wird;
  - Speichern der Einstellung;und daß es folgende weiteren Kontrollschritte nach Schritt D aufweist:
  - Anregen des zweiten Fluorochroms von mit diesem

Fluorochrom markierten zu messenden Zellen mit dem Laserstrahl;

- Einstellen der gespeicherten Einstellung;
- Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des zweiten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im zweiten Fluoreszenzkanal; und
- Vergleichen des gemessenen Signals mit dem in Schritt D gemessenen Signal.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es folgende weitere Kontrollschritte aufweist:

- Anregen des ersten Fluorochroms von mit diesem Fluorochrom markierten zu messenden Zellen mit dem Laserstrahl;
- Messen des Fluoreszenz-Emissions-Signals des ersten Fluorochroms in den zu messenden Zellen im ersten Fluoreszenzkanal;
- Vergleichen des gemessenen Signals mit dem gespeicherten Signal und mit dem bei der Messung in Schritt D erhaltenen Signal.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es zur gleichzeitigen fluorometrischen Bestimmung von zumindest zwei Apoptose-Parametern verwendet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Parameter die Caspasen-Aktivierung und die Mitochondrien-Aktivierung sind.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Caspasen-Aktivierung durch Messung der Degradierung

eines Caspase-Zielpeptids bestimmt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Mitochondrien-Aktivierung durch Messung von Membranpotentialveränderungen der Mitochondrien-Membran bestimmt wird.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das erste Fluorochrom zumindest ein Caspase-spaltbares Rhodamin 110-Derivat ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Rhodamin 110-Derivat ein Peptid-Rhodamin 110 aufweist.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Rhodamin 110 Derivat (AspGluValAsp)2-Rhodamin 110 und/oder (Asp)2-Rhodamin 110 enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Fluorochrom ein Membranpotential-sensitives Fluorochrom ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Membranpotential-sensitive Fluorochrom 3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid ist.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Anregung bei einer Wellenlänge von 488 nm erfolgt.

1/1

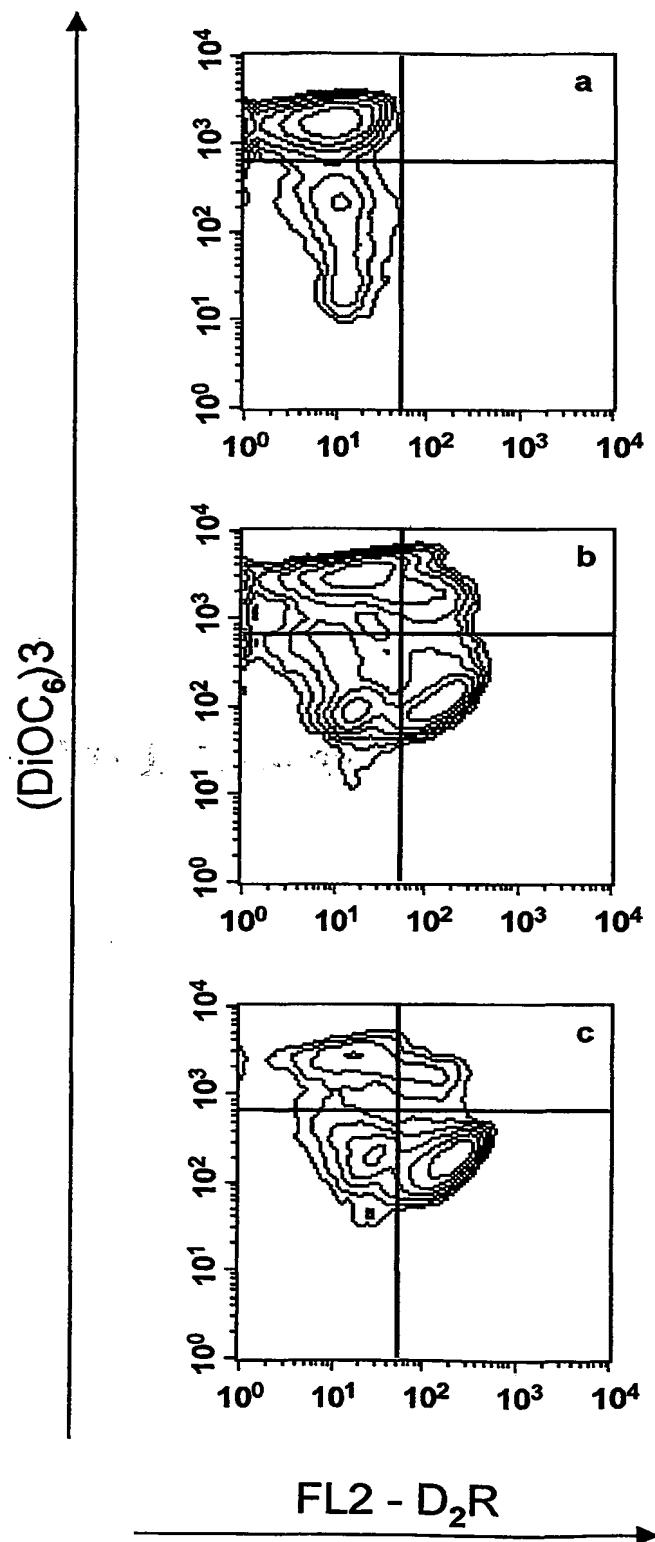


Fig. 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(